

⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 56 064 A 1**

⑮ Int. Cl. 7:

**C 07 H 21/04**

G 01 N 33/50

G 01 N 30/48

G 01 N 1/28

⑯ Aktenzeichen: 198 56 064.8

⑯ Anmeldetag: 4. 12. 1998

⑯ Offenlegungstag: 29. 6. 2000

⑰ Anmelder:  
InViTek GmbH, 13125 Berlin, DE

⑰ Erfinder:  
Hillebrand, Timo, Dr., 12619 Berlin, DE; Bendzko, Peter, Dr., 12623 Berlin, DE

⑯ Entgegenhaltungen:

DE 196 38 362 C1

DE 197 31 670 A1

WO 9 41 580 A1

Chem. Abstr. 126:259723;

Chem. Abstr. 122:97852;

Chem. Abstr. 121:250364;

Chem. Abstr. 119:174883;

Chem. Abstr. 115:131349;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen  
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Universelles Verfahren zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien

DE 198 56 064 A 1

DE 198 56 064 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein universelles Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) aus beliebigen Ausgangsmaterialien und Mengen, welche DNA enthalten, unter Vermeidung der Anwendung chaotroper Substanzen. Die Anwendungsgebiete des Verfahrens sind alle mit DNA-Isolierungen sich beschäftigenden Laboratorien, wie forensische Medizin, Lebensmittel-diagnostik, medizinische Diagnostik, Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik und alle anderen angrenzenden Gebiete.

Unter klassischen Bedingungen erfolgt die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben dadurch, daß die Ausgangsmaterialien unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, teilweise auch unter Verwendung von proteinabbauenden Enzymen aufgeschlossen, die austretenden Nukleinsäurefraktionen über Phenol-/Chloroform-Extraktionsschritte gereinigt und die Nukleinsäuren mittels Dialyse oder Ethanolpräzipitation aus der wäßrigen Phase gewonnen werden (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning").

Diese "klassischen Verfahren" zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen und besonders aus Geweben sind sehr zeitaufwendig (teilweise länger als 48 h), erfordern einen erheblichen apparativen Aufwand und sind darüber hinaus auch nicht unter Feldbedingungen realisierbar. Außerdem sind solche Methoden auf Grund der verwendeten Chemikalien wie Phenol und Chloroform in einem nicht geringen Maße gesundheitsgefährdend.

Verschiedene alternative Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterialien ermöglichen die aufwendige und gesundheitsschädigende Phenol-/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren zu umgehen sowie eine Reduzierung der zeitlichen Aufwendungen zu erreichen.

Alle diese Verfahren basieren auf einer von Vogelstein und Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615-619) entwickelten und erstmals beschriebenen Methode zur präparativen und analytischen Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die Methode kombiniert die Auflösung der die zu isolierende DNA-Bande enthaltende Agarose in einer gesättigten Lösung fixierte DNA wird anschließend mit einer Waschlösung (20 mM Tris HCl [pH 7,2]; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA; 50% v/v Ethanol) gewaschen und abschließend von den Trägerpartikeln abgelöst.

Diese Methode erfuhr bis heute eine Reihe von Modifikationen und wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt für unterschiedliche Verfahren der Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Herkünften angewendet (Marko, M. A., Chippendall, R. und Birnboim, H. G., 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387).

Darüber hinaus existieren heute weltweit auch eine Vielzahl von Reagenzien-systemen, vor allem zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und für die Isolierung von Plasmid DNA aus bakteriellen Lysaten, aber auch für die Isolierung von längerkettigen Nukleinsäuren (genomische DNA, zelluläre Gesamt-RNS) aus Blut, Geweben oder auch Zellkulturen.

Alle diese kommerziell verfügbaren Kits basieren auf dem hinlänglich bekannten Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger unter Anwesenheit von Lösungen unterschiedlicher chaotroper Salze und verwenden als Trägermaterialien Suspensionen feingemahlener Glas-pulver (z. B. Glasmilch, BIO 101, La Jolla, CA), Diatomen-erde (Fa. Sigma) oder auch Silicagele. (Diagen, DE 41 39 664 A1).

Ein für eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen praktikables Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren ist in US 5.234.809 (Boom) dargestellt. Dort ist ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus nukleinsäurehaltigen

Ausgangsmaterialien durch die Inkubation des Ausgangsmaterials mit einem chaotropen Puffer und einer DNA-bindenden festen Phase beschrieben. Die chaotropen Puffer realisieren sowohl die Lyse des Ausgangsmaterials wie auch die Bindung der Nukleinsäuren an die feste Phase. Das Verfahren ist gut geeignet, um Nukleinsäuren aus kleinen Probenmengen zu isolieren und findet speziell im Bereich der Isolierung viraler Nukleinsäuren seine praktische Anwendung.

Entscheidende Nachteile des Verfahrens bestehen aber u. a. darin, daß der durch die chaotropen Puffer realisierte Aufschluß nicht für alle Materialien einsetzbar ist bzw. auch für größere Mengen an Ausgangsmaterialien nur extrem ineffizient und unter einem großen Zeitaufwand realisiert werden kann. Darüber hinaus sind mechanische Homogenisierungsverfahren notwendig, wenn z. B. DNA aus Gewebe-proben isoliert werden soll. Weiterhin müssen für verschiedene Fragestellungen DNA aus Gewebe-proben isoliert werden soll. Weiterhin müssen für verschiedene Fragestellungen auch immer verschiedene hohe Konzentrationen unterschiedlicher chaotroper Puffer eingesetzt werden. Das Verfahren ist damit in keiner Weise universell einsetzbar.

Das physiko-chemische Prinzip der nach dem bekannten Stand der Technik heute eingesetzten und kommerziell verfügbaren Systeme zur Isolierung von Nukleinsäuren auf der

Basis der Bindung von Nukleinsäuren an die Oberflächen mineralischer Träger soll dabei in der Störung übergeordneter Strukturen des wässrigen Millieus bestehen, durch welche die Nukleinsäuren an der Oberfläche von mineralischen Materialien, insbesondere von Glas- bzw. Silicapartikeln adsorbieren. Die Störung der übergeordneten Strukturen des wässrigen Millieus erfolgt dabei immer unter Anwesenheit chaotroper Ionen und ist bei hohen Konzentrationen dieser fast quantitativ. Auf dieser beschriebenen physiko-chemischen Basis enthalten alle kommerziell verfügbaren Systeme zur Isolierung von Nukleinsäuren Pufferkompositionen mit hohen Ionenstärken chaotroper Salze, für die Bindung von Nukleinsäuren an eine Nukleinsäuren-bindende feste Phase.

Spezifische Modifikationen dieser Verfahren betreffen den Einsatz von spezifischen Trägermaterialien, welche für bestimmte Fragestellungen applikative Vorteile zeigen (Invitex GmbH WO 95/34569), die jedoch die gleichen Nachteile aufweisen.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein Verfahren zur DNA-Isolierung bereitzustellen, das einfach und universell anwendbar ist.

Überraschend wurde festgestellt, daß zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien das DNA enthaltende Material ohne Verwendung chaotroper Substanzen mit einem

60 - neuartigen Lys/Bindungspuffersystem, welches eine wässrige Lösung umfaßt, die eine nichtchaotrop Salzkomponente und eine lysierende Komponente aufweist,  
- und einer beliebigen festen Phase in Kontakt gebracht wird,

65 wodurch Lyse und Bindung der DNA an die feste Phase erfolgt. Anschließend wird das System nach an sich bekannten Methoden gewaschen und die DNA von der festen Phase gelöst.

Bevorzugte Ausgangsmaterialien sind DNA enthaltende

komplexe Ausgangsmaterialien, wie kompakte Pflanzenmaterialien, wie z. B. Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc., klinisch relevanten Proben, wie z. B. Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen, Lebensmittel, wie z. B. Fisch, Wurst, Konserven, Milch, forensischen Proben, wie z. B. Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren und andere Proben, die DNA enthalten.

Bevorzugte Salzkomponenten im Sinne der Erfindung sind Ammoniumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid und/oder Natriumchlorid und alle Salze mit analogen Eigenschaften. Erstaunlicherweise reichen für die Bindung der DNA an die festen Träger schon geringe Konzentrationen an diesen Salzen von vorzugsweise  $\leq 1 \text{ M}$ , bei bestimmten Applikationen bevorzugt sogar Konzentrationen  $\leq 0,5 \text{ M}$ .

Als lysierende Komponenten werden bevorzugt anionische, kationische oder neutrale Detergentien, wie z. B. SDS, TritonX100 oder CTAB eingesetzt, und/oder Protein-abbauende Enzyme.

Nach der erfolgten Lyse des Ausgangsmaterials wird die Suspension ggf durch einen kurzen Zentrifugationsschritt von noch nicht vollständig lysierten Bestandteilen abgetrennt und mit dem DNA-bindenden Material direkt inkubiert bzw. eine für die Bindung der DNA an das eingesetzte Trägermaterial Optimierung erfolgt durch die Zugabe einer alkoholhaltigen Lösung, wie z. B. Isopropanol oder EtOH.

Gegebenenfalls befinden sich im Lyse/Puffersystem zusätzlich geringe Konzentrationen ( $< 50 \text{ mM}$ ) an EDTA oder Tris-HCl. Für die Isolierung von DNA aus sehr stark verunreinigten Ausgangsmaterialien erfolgt erfindungsgemäß bevorzugt der Zusatz von 2-4% Polyvinylpyrrolidone zum Puffersystem zur selektiven Bindung von inhibitorischen Komponenten.

Als Bindungsmaterialien für die zu isolierende DNA haben sich bevorzugt kommerziell verfügbare Glasfaservliese in Zentrifugationssäulen (Fa. LIDA), Siliziumverbindungen wie  $\text{SiO}_2$  unterschiedlicher Teilchengröße wie auch sog. AEROSILE hervorragend bewährt. Nach der Inkubation mit dem DNA-bindenden Material erfolgt die Abtrennung des Lysates vom Bindungsmaterial durch einen kurzen Zentrifugationsschritt. Nachfolgend wird in an sich bekannter Weise mit einem Waschpuffer z. B. bestehend aus mindestens 50% Ethanol und gegebenenfalls einer geringen Salzkonzentration z. B. NaCl gewaschen, das Trägermaterial wird getrocknet und die gebundene DNA mittels eines an sich bekannten Niedrigsalzpuffers (Tris-HCl; TE; Wasser) und gegebenenfalls bei einer Temperatur von 50-70°C eluiert.

Überraschend fungieren als Trägermaterialien alle Materialien, die für die bisherige Isolierung mit chaotropen Reagenzien einsetzbar sind.

Eine weitere Ausführungsvariante der Erfindung besteht darin, daß zur Lyse von schwer aufschließbaren Ausgangsmaterialien, z. B. kompakten Gewebeproben, Haarwurzeln bzw. zur Optimierung der Lyseeffizienz und zur Reduzierung notwendiger Lysezeiten der Zusatz von Protein-abbauenden Enzymen, vorzugsweise Proteinase K, wie z. B. Proteinase K, erfolgt.

Überraschend benötigt das erfindungsgemäße Verfahren für die Bindung von Nukleinsäuren an Trägermaterialien wie z. B. Glasfaservliese, Nanopartikel aus Siliciummaterial oder  $\text{SiO}_2$ -Partikel keine chaotropen Salze. Darüber hinaus ist auch die für eine Bindung von DNA notwendige Ionenstärke erstaunlicherweise sehr niedrig. Diese Ergebnisse zeigen damit eindeutig, daß die Adsorption von Nukleinsäuren an die Oberflächen mineralischer Träger auch über andere Mechanismen realisiert werden kann, bzw. das der beschriebene Mechanismus nicht zutreffend ist.

Die der Erfindung zugrunde liegenden experimentellen Daten zeigen, daß offensichtlich lediglich eine Minimalkonzentration an Ionen für eine Adsorption von Nukleinsäuren an ein Trägermaterial hinreichende Bedingung ist.

5 Diese Entdeckung ermöglichte, ein neues und universell einsetzbares Verfahren zur Isolierung von DNA aus allen DNA enthaltenden Ausgangsmaterialien wie auch aus beliebigen Mengen an unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien zur Verfügung zu stellen, wobei das eingesetzte Verfahren mit einem Puffersystem zur Bindung der DNA an ein mineralisches Trägermaterial realisiert werden kann, welches keine chaotropen Ionen enthält, nur eine geringe Ionenstärke aufweist und darüber hinaus für alle Ausgangsmaterialien aus denen DNA isoliert werden soll über eine universelle Lyse dieser Materialien universell eingesetzt werden kann.

10 In seiner allgemeinsten Anwendungsvariante kann mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens aus allen dem Stand der Technik entsprechenden für eine DNA-Extraktion ausgewählten komplexen Ausgangsmaterialien eine Nukleinsäureextraktion durchgeführt werden, d. h. mittels des neuen universellen Puffersystems kann die hocheffiziente Lyse und nachfolgende Nukleinsäurebindung an einen mineralischen Träger aus kompakten Pflanzenmaterialien (z. B. Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc.), aus klinisch relevanten Proben (z. B. Vollblut; Gewebe, Mikrobioplate, paraffinierte Materialien, ercp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen), aus Lebensmitteln (z. B. Fisch, Wurst, Konserven, Milch), aus forensischen Proben (z. B. Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren) wie auch aus anderen Ausgangsmaterialien erfolgreich, extrem einfach und sehr schnell durchgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht auch darin, daß die Isolierung von DNA dabei sowohl aus extrem geringen Ausgangsmaterialien (z. B. Isolierung von DNA aus 1  $\mu\text{l}$  Vollblut; Haarwurzel, Mikrobiopsie  $< 1 \text{ mg}$ ) wie auch aus sehr großen Mengen an Ausgangsmaterialien wie z. B. 50 ml Vollblut;  $> 1 \text{ g}$  Gewebermaterial,  $> 1 \text{ g}$  Pflanzenmaterial hocheffizient durchgeführt werden kann.

Weitere Vorteile des Verfahrens resultieren daraus, daß die eingesetzten Puffer aufgrund des Fehlens chaotroper Chirurkalien auch nicht mehr toxisch oder ätzend wirken.

Neben einer allgemeinsten Ausführungsvariante erlauben Optimierungen des Extraktionsverfahrens bezogen auf spezifische Applikationen sogar eine fast quantitative Isolierung der in der Ausgangsprobe enthaltenen DNA-Mengen. Erstaunlicherweise können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ohne die nach dem Stand der Technik eingesetzten chaotropen Ionen hoher Konzentration für eine DNA-Bindung, höhere DNA-Ausbeuten erzielt werden, als dies mit kommerziell verfügbaren und hochoptimierten Extraktionskits möglich ist.

Neben der Isolierung von DNA aus allen DNA enthaltenden komplexen Ausgangsmaterialien, ermöglicht eine weitere Ausführungsvariante des erfindungsgemäßen Verfahrens auch die Isolierung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Lysaten hocheffizient und ohne den Einsatz von nach dem Stand der Technik zur Bindung der Plasmid DNA an mineralische Trägermaterialien an sich notwendigen chaotropen Salzen. So werden nach der bekanntermaßen alkalischen

60 Lyse der Bakterienzellen die anschließende Neutralisationsreaktion mittels Natrium- oder Kaliumacetat erfindungsgemäß durch Zusatz des neuen Lysebindungspuffersystems, nämlich durch Zusatz eines oder mehrerer Salze, wie z. B. Ammoniumchlorid, Calciumchlorid oder Kaliumchlorid durchgeführt. Nach Abzentrifugation der Proteine und chromosomal DNA wird der Überstand nachfolgend wieder mit einer DNA-bindenden Matrix inkubiert, gewaschen und die Plasmid-DNA eluiert.

Die erfindungsgemäße Verfahrensvariante zur Isolierung von Plasmid-DNA hat den Vorteil, das das resultierende Pellet aus Proteinen und chromosomaler DNA viel fester pelleiert war als dies mit Puffern, die chaotropen Salze enthalten zu beobachten war. Dies ist ein wichtiger Vorzug um eine Kontamination mit Proteinen bzw. chromosomaler DNA zu verhindern. Darüber hinaus wurde die für die Pelletierung notwendige Zentrifugationszeit drastisch reduziert. Die erhaltenen Ausbeuten an Plasmid-DNA sind dabei gegenüber mit herkömmlichen kommerziell verfügbaren Verfahren isolierten Ausbeuten identisch. Das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch zeitsparender, enthält keine chaotropen und damit toxischen oder ätzenden Bestandteile und ist letztlich durch die nur geringen Ionenstärken, welche benötigt werden, in der Herstellung sehr viel preiswerter als alle anderen bekannten Systeme.

Alle mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierte DNA kann für die bekannten und eingesetzten nachfolgenden Reaktionen eingesetzt werden (z. B. PCR, Restriktionsverdau, Mutationsnachweis etc.)

Außerdem betrifft die Erfindung einen Testkit zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien der

- eine wässrige Lösung, die eine nichchaotrop Salzkomponente und eine lysierende Komponente aufweist,
- eine feste Phase und
- an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer umfaßt.

Vorzugsweise enthält er zusätzlich einen Alkohol. Als lysierende Komponente enthält der Testkit bevorzugt ein Detergent und/oder ein Protein-abbauendes Enzym. Als feste Träger werden bevorzugt Glasfaservliese, Glasmembranen und Siliciumträger unterschiedlicher Teilchengröße sowie Aerosile eingesetzt.

Anschließend wird die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### 1. Isolierung genomicscher DNA aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien

Jeweils 50–100 mg des pflanzlichen Ausgangsmaterials wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert und nachfolgend in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Zugabe von 500 µl Lysepuffer (2% CTAB; 2% Polyvinylpyrrolidon, 10 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA und 1,3 M Ammoniumchlorid) und Inkubation für mindestens 30 min bei 65°C.

Abzentrifugieren unlysierten Komponenten und Mischen des Überstandes mit 200 µl Isopropanol.

Überführen der Lösung auf eine Zentrifugationsäule mit einer Glasfasermembran (Micro Spin Säule; Fa. LIDA).

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm. Verwerfen des Filtrates und 2 maliges Waschen der Membran mit einem Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 70% v/v Ethanol).

Nach Ethanolentfernung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm für 2 min) Zugabe von 200 µl eines Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,7) und Elution der DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm.

Jeweils 20 µl der eluierten DNA wurden auf ein Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (Abb. 1)

#### 2. Simultane Isolierung genomicscher DNA aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien mit einem Universalpuffersystem

5 Für die Isolierung wurden folgende Proben eingesetzt: 1-Vollblut gefroren; 50 µl, 2-Vollblut; 100 µl, 3-Gurke; 50 mg, 4-Tomatcnfanzcnblatt; 100 mg; 5-Speichelprobe; 100 µl, 6-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 5 mg, 7-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 20 mg, 8-Haarwurzel, 9-10 Putensalami; 50 mg, 10-Eibe, Nadeln, 100 mg Alle Proben wurden in 500 µl Lysepuffer (2% CTAB; 2% Polyvinylpyrrolidon, 10 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA und 1,5 M Ammoniumchlorid) und mit Ausnahme aller pflanzlichen Proben unter Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 65 inkubiert.

Die Lysate wurden nachfolgend mit 200 µl Isopropanol versetzt und auf eine Zentrifugationssäule mit einer Glasfasermembran (Micro Spin Säule; Fa. LIDA) überführt.

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm. Verwerfen des 20 Filtrates und 2 maliges Waschen der Membran mit einem Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 70% v/v Ethanol).

Nach Ethanolentfernung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm für 2 min) Zugabe von 50–200 µl eines Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,7) und Elution der DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm.

Jeweils 1/5 der eluierten DNA wurden auf ein Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (Abb. 2).

30 3. Isolierung genomicscher DNA aus zwei unterschiedlichen Mengen (50 µl und 200 µl) an Vollblutproben im Vergleich mit einem kommerziell verfügbaren Extraktionssystem auf der Basis chaotroper Salze und der Bindung der DNA an eine Trägermembran in einer Zentrifugationsäule

Überführung der Vollblutproben in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß und Auffüllen der Proben mit PBS-Puffer auf ein Volumen von 200 µl (50 µl-Proben). Zugabe von 200 µl Lysepuffer (2% CTAB; 2% Polyvinylpyrrolidon, 10 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA und 1,5 M Ammoniumchlorid) und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) und Inkubation für 10 min bei 65°C.

Zugabe von 200 µl Isopropanol und Beladen einer Zentrifugationsäule mit einer Glasfasermembran (Micro Spin Säule; Fa. LIDA).

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm. Verwerfen des Filtrates und 2 maliges Waschen der Membran mit einem Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 70% v/v Ethanol).

Nach Ethanolentfernung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm für 2 min) Zugabe von 100 µl (50 µl-Probe) bzw. 200 µl (200 µl-Probe) eines auf 65°C erwärmten Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl; pH 8,7) und Elution der DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm.

Jeweils 20 µl der eluierten DNA wurden auf ein Agarosegel geladen und nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt (Abb. 3).

#### Patentansprüche

60 1. Verfahren zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien, dadurch gekennzeichnet, daß man das DNA enthaltende Material ohne Verwendung chaotroper Substanzen mit einem Lyse/Bindungspuffersystem, umfassend eine wässrige Lösung, die eine nichchaotrop Salzkomponente und eine lysierende Komponente aufweist, und einer festen Phase in Kon-

takt bringt, anschließend wäscht und von der festen Phase löst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Ausgangsmaterialien kompakte Pflanzenmaterialien, wie Früchte; Samen; Blätter; Nadeln etc., klinisch relevanten Proben, wie Vollblut; Gewebe, Mikrobiopatate, paraffinische Materialien, rcp-proben, Tupfermaterial von Abstrichen, Lebensmittel, wie Fisch, Wurst, Konserven, Milch, forensischen Proben, wie Haarwurzeln, Zigarettenkippen, Blutspuren und andere Proben, die DNA enthalten, sind. 10

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem zur Bindung an die feste Phase eine geringe Ionenstärke aufweist. 15

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ionenstärke  $\leq 1 \text{ M}$  ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die nichtchaotrope Salzkomponente Ammoniumchlorid, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid und/oder Magnesiumchlorid ist. 20

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem zur Bindung an die feste Phase einen Alkohol aufweist. 25

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem Protein-abbauende Enzyme, vorzugsweise mindestens eine Proteinase, enthält. 30

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem geringe Konzentrationen EDTA oder Tris-HCl enthält.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Lyse/Bindungspuffersystem 2-4% Polyvinylpyrrolidon enthält. 35

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß als feste Phase alle Trägermaterialien eingesetzt werden, die bei der Isolierung mit chaotropen Reagentien Anwendung finden, vorzugsweise Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger und Aerosile sind. 40

11. Testkit zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien enthaltend 45

- eine wässrige Lösung, die eine nichtchaotrope Salzkomponente und eine lysierende Komponente aufweist,
- eine feste Phase
- an sich bekannte Wasch- und Elutionspuffer. 50

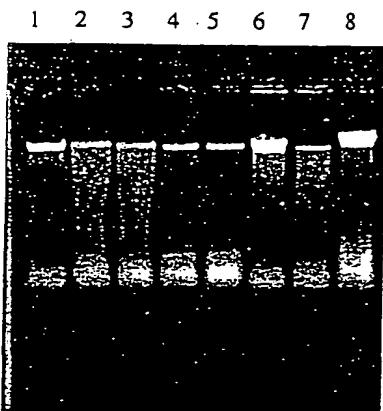
12. Testkit nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Alkohol enthält.

13. Testkit nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Phase Glasfaservliese, Glasmembranen, Siliciumträger und Aerosile sind. 55

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Anhang:

Abb. 1: Gelelektrophoretische Darstellung isolierter genomischer DNA aus unterschiedlichen Pflanzenproben (0.8% TAE-Agarosegel; Ethidiumbromid gefärbt)

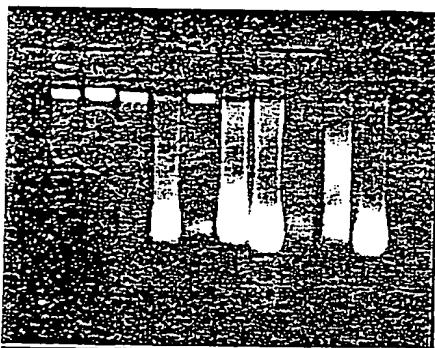


Spuren:

- 1-Zwiebel (frisch);
- 2-Schnittlauch (frisch; grün)
- 3-Schnittlauch (frisch; grün)
- 4-Geranie (hängend; Blüten und Blätter; frisch)
- 5-Geranie (stehend; Blätter; frisch)
- 6-Eibe (Nadeln; frisch)
- 7-Mäuseschwanzgras (frisch; Blätter; grün)
- 8-Reinfarn (frisch; grün; Blätter)

Abb. 2: Gelelektrophoretische Darstellung isolierter genomischer DNA aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (0.8% TAE-Agarosegel; Ethidiumbromid gefärbt)

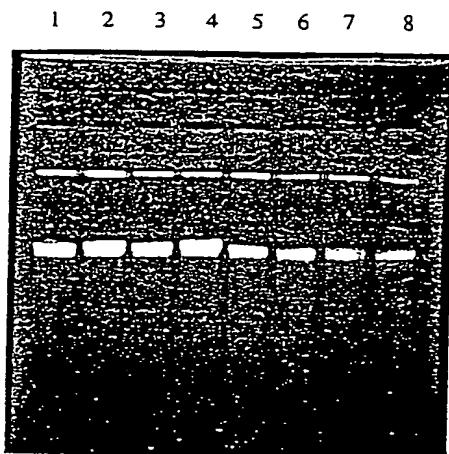
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Spuren:

1-Vollblut gefroren; 50µl, 2-Vollblut; 100µl, 3-Gurke; 50 mg, 4-Tomatenpflanzenblatt; 100 mg;  
5-Speichelprobe; 100µl, 6-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 5mg, 7-Geflügelleber; Lebensmittel gefroren; 20mg,  
8-Haarwurzel, 9-Putensalami; 50mg, 10-Eibe, Nadeln, 100mg

Abb. 3: Gelelektrophoretische Darstellung isolierter genomicscher DNA aus 50 $\mu$ l Vollblut bzw. 200 $\mu$ l Vollblut im Vergleich mit einem kommerziell verfügbaren Extraktionskit auf der Basis chaotroper Ionen (0.8% TAE-Agarosegel; Ethidiumbromid gefärbt)



Obere Spur: Proben 1-4; DNA isoliert mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens; Proben 5-8 isoliert mittels eines kommerziell verfügbaren Kits aus jeweils 50 $\mu$ l Vollblut

Untere Spur: Proben 1-4; DNA isoliert mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens; Proben 5-8 isoliert mittels eines kommerziell verfügbaren Kits aus jeweils 200 $\mu$ l Vollblut